

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700511

 研究課題名（和文）実験用魚類および両生類における始原生殖細胞のガラス化低温保存による
 遺伝資源の保存

 研究課題名（英文）Conservation of genetic resources of experimental fish and amphibian
 by vitrification of primordial germ cells

研究代表者

檜垣 彰吾 (HIGAKI SHOGO)

立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・ポストドクトラルフェロー

研究者番号：70595256

研究成果の概要（和文）：

本研究により、実験用魚類として重要なゼブラフィッシュにおいて、その始原生殖細胞のガラス化低温保存に最適な凍害防止溶液が開発されるとともに、新たに開発した凍害防止溶液を用いて低温保存した始原生殖細胞が機能的な配偶子へと発生・分化することを確認した。これにより、現在生体を継代飼育することで維持されている膨大な数のゼブラフィッシュの系統が、安価で安全に保存できるようになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Through this study, suitable vitrification solution for cryopreserving zebrafish primordial germ cells was developed. Differentiation ability of the primordial germ cells cryopreserved with the established solution was confirmed. In the absence of other promising cryopreservation methods for zebrafish embryos and oocytes, the established cryopreservation method of primordial germ cells can be applicable for cryobanking and restoration of genetic resources of zebrafish.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：低温生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：魚類・始原生殖細胞・低温保存・ガラス化

1. 研究開始当初の背景

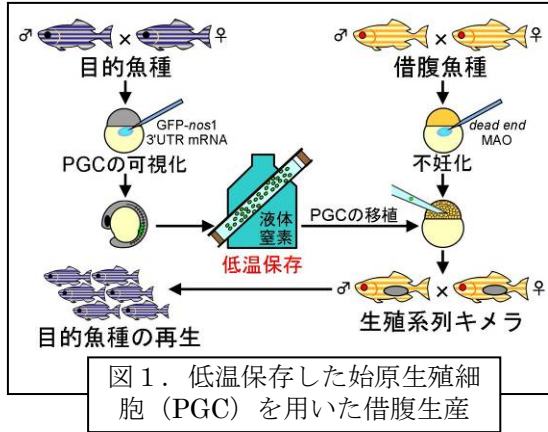
近年のライフサイエンス研究の発展は、いわゆる“モデル実験動物”の使用に負うところが大きい。これに伴い、膨大な数の系統が作出されており、それらの生物遺伝資源の保存が課題となっている。

マウスやラットと言った哺乳類実験動物では、それらの配偶子や胚を低温保存することにより遺伝資源の保存が可能となっているが、ゼブラフィッシュやネッタイツメガエルと言った実験用魚類や両生類の卵子や胚の低温保存法は開発されておらず、現状では生体を継代飼育することにより系統を維持している。

このような背景のもと、申請者はゼブラフィッシュの胚をナイロンメッシュ上で急速冷却（ガラス化）することによる始原生殖細胞の低温保存法を開発するとともに、この方法に研究協力者らが開発した哺乳類卵巣組織ガラス化用溶液（Kagawa et al. *Reprod Biomed Online* 2009）を適用し、低温保存した始原生殖細胞を用いた借腹生産（図1）が配偶子や胚の低温保存の代替と成り得ることを明らかとした。

しかし、上述のように胚のガラス化に用いた溶液は哺乳類卵巣組織ガラス化用溶液であり、また低温保存した始原生殖細胞を用いた借腹生産の成功率は非常に低かったこと

から、魚類始原生殖細胞の低温保存に適した凍害防止溶液の開発が望まれる。また、実験用両生類においても遺伝資源の保存法の開発が望まれており、魚類と同様に体外で受精・発生することから申請者らは魚類で開発した技術は両生類にも応用可能であると考えられる。



2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究計画では、魚類始原生殖細胞の低温保存に最適な凍害防止溶液の開発および、魚類で開発された低温保存法の両生類への応用を目的とした。

具体的な研究項目は、

- (1) 魚類始原生殖細胞の低温保存に最適な凍害防止溶液の開発
- (2) 新たな凍害防止溶液で低温保存した始原生殖細胞の配偶子への発生・分化能の確認
- (3) 改良した魚類始原生殖細胞低温保存法の両生類への応用の3つとした。

3. 研究の方法

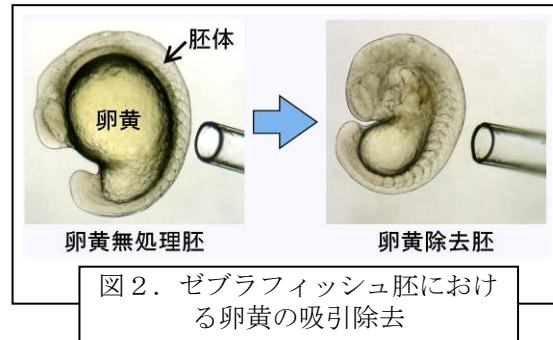
(1) 魚類始原生殖細胞の低温保存に最適な凍害防止溶液の開発

①卵黄除去したゼブラフィッシュ胚のガラス化に適した凍害防止剤の選抜

申請者は始原生殖細胞の位置する胚体深部への凍害防止物質の浸透性を改善するため、卵黄を吸引除去した胚（卵黄除去胚：図2）をガラス化することによる始原生殖細胞の低温保存法を考案した。

しかし、卵黄除去した胚に対する、各種凍害防止剤の影響は不明であったことから、卵黄を除去した胚、および卵黄を除去しなかった胚をエチレンジリコール (EG)、ジメチルスルフォキシド (Me₂SO) およびプロピレンジリコール (PG) のいずれか1種類を3 M含む Pretreatment solution (PS) および5 M含む Vitrification solution (VS) に様々な時

間浸漬後、急速冷却（ガラス化）し、加温後における始原生殖細胞の生存性を調べることで、卵黄除去の影響および卵黄除去胚に適した凍害防止剤の選抜を行った。



②卵黄除去したゼブラフィッシュ胚のガラス化に適した凍害防止剤の組合せおよび濃度の決定

申請者は卵黄無処理胚のガラス化時に凍害防止剤を複数組み合わせることで、加温後の始原生殖細胞の生存性が改善することを明らかにした (Higaki et al. Jpn J Vet Res 2009)。しかし、卵黄除去胚に対する混合凍害防止剤の影響は不明であった。そこで次に、EG、Me₂SO、PGのうち2種類を2 M + 1 M含むPSおよび3 M + 2 M含むVSを用いて卵黄除去胚をガラス化し、加温後の始原生殖細胞の生存率を調べることで始原生殖細胞の低温保存に最適な凍害防止剤の組合せと濃度を決定した。

(2) 新たな凍害防止溶液で低温保存した始原生殖細胞の配偶子への発生・分化能の確認

始原生殖細胞の配偶子への発生・分化能を、始原生殖細胞の移植による借腹生産技術（図1）を用いて確認した。

具体的には、卵黄を除去したストライプタイプゼブラフィッシュ胚（目的魚種）を最適だと考えられる凍害防止溶液を用いてガラス化し、加温後に単離した始原生殖細胞を不妊化したゴールデンタイプゼブラフィッシュ胚（借腹魚種）へと移植した。その後、移植胚を性成熟（3~4ヶ月齢）まで飼育し、無処理のゴールデンタイプゼブラフィッシュと交配させた。ゴールデンタイプゼブラフィッシュの体色遺伝子は男性であることから、交配により得られたF1の表現型がストライプタイプとなれば移植した低温保存始原生殖細胞が配偶子へと発生・分化したことが確認される。

4. 研究成果

(1) 魚類始原生殖細胞の低温保存に最適な凍害防止溶液の開発

①卵黄除去したゼブラフィッシュ胚のガラス化に適した凍害防止剤の選抜

1 種類の凍害防止剤を含む溶液を用いた場合、卵黄除去により生存始原生殖細胞数は増加し、卵黄除去が胚のガラス化による始原生殖細胞の低温保存に有効であることが確認された。

始原生殖細胞の生存率は、EG を含む凍害防止溶液を用いた場合で高く、卵黄除去胚をガラス化した場合、最大で約 65%であり、ガラス化しなかった新鮮胚に含まれる始原生殖細胞数(約 12 個)に比べ有意に少なかった。

また、始原生殖細胞に特有な仮足運動を示す細胞(斜線部分)は、Me₂SO および PG を用いた場合ほとんど得られず、EG を用いた場合においても最大で約 2 個/胚と少なく、PS および VS に含まれる高濃度の凍害防止剤の毒性が示唆された(図 3)。

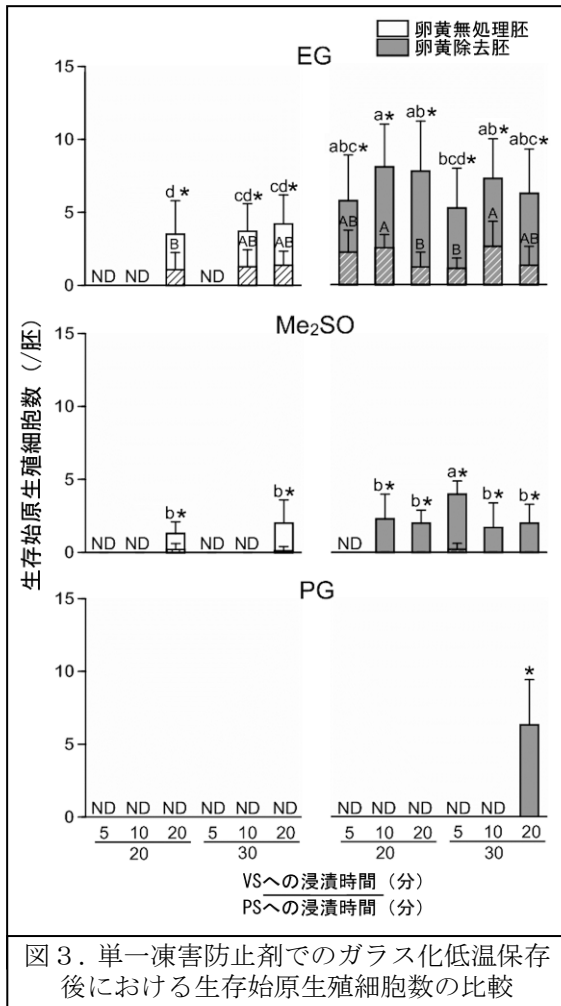


図 3. 単一凍害防止剤でのガラス化低温保存後における生存始原生殖細胞数の比較

②卵黄除去したゼブラフィッシュ胚のガラス化に適した凍害防止剤の組合せおよび濃度の決定

2 種類の凍害防止剤を含む溶液を用いるこ

とで、生存始原生殖細胞数は大幅に増加した。このことから、卵黄除去胚においても混合凍害防止剤の有効性が確認された。

混合凍害防止剤の中でも特に、3 M EG + 2 M Me₂SO を含む VS を用いた場合で、生存始原生殖細胞数が多く、最大で平均約 10 個/胚の生存始原生殖細胞が得られ、新鮮胚に含まれる始原生殖細胞数と有意な差が無かった(図 4)。このことから、胚のガラス化によるゼブラフィッシュ始原生殖細胞の低温保存には、2 M EG + 1 M Me₂SO を含む PS および 3 M EG + 2 M Me₂SO を含む VS が最適であることが明らかとなった(図 4)。

また、この凍害防止溶液を用いた場合、比較的短時間の浸漬(PS: 20 分、VS: 10 分)後にガラス化することで、最大で約 55%の始原生殖細胞で活発な仮足運動が確認された(斜線部分)。

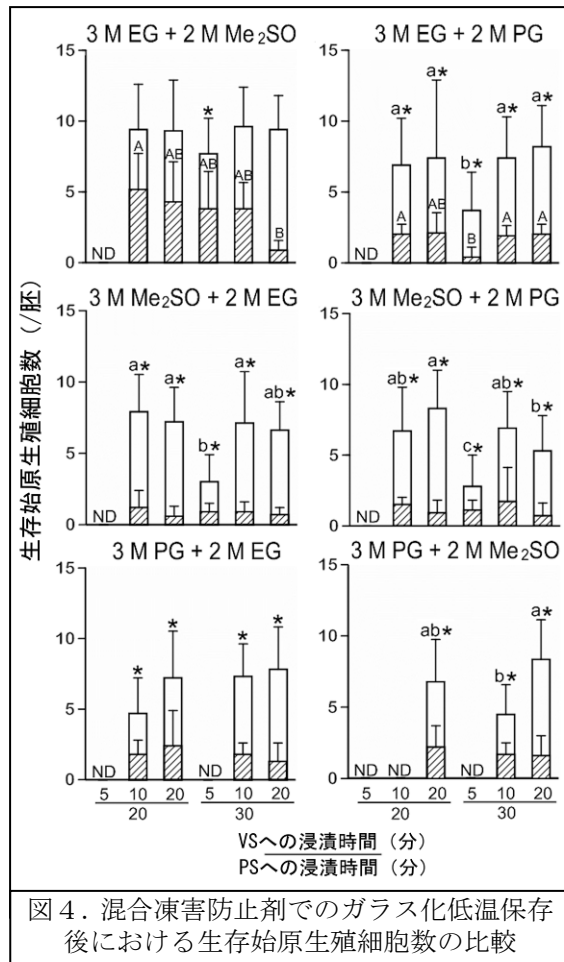


図 4. 混合凍害防止剤でのガラス化低温保存後における生存始原生殖細胞数の比較

(2) 新たな凍害防止溶液で低温保存した始原生殖細胞の配偶子への発生・分化能の確認
低温保存した始原生殖細胞が機能的な配偶子へと発生・分化することを確認するため、2 M EG + 1 M Me₂SO を含む PS および 3 M EG + 2 M Me₂SO を含む VS を用い、PS: 20 分、VS: 10 分の浸漬条件下でストライプタイプゼブラフィッシュ胚(ドナー)をガラス化し、加温

後に始原生殖細胞を不妊化したゴールデンタイプゼブラフィッシュ胚（レシピエント）236 個へ移植した。

性成熟まで生残したレシピエント 7 匹（雄 6 匹、雌 1 匹）の交配試験の結果、全てのレシピエントからドナー由来の産子が得られた。このことから、低温保存後に移植した始原生殖細胞が、機能的な精子および卵子へと発生・分化したことが確認された（図 5）。

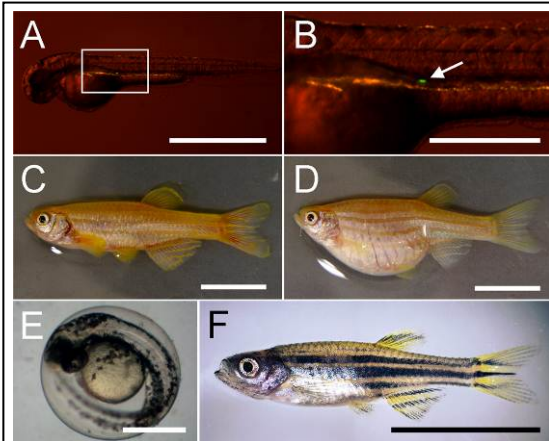


図 5. 低温保存後の始原生殖細胞を移植したレシピエント胚とその産子

A: レシピエント（低倍）、B: レシピエント（高倍）、C: 性成熟に達したレシピエント雄、D: 性成熟に達したレシピエント雌、E: 産子（受精 2 日後）、F: 産子（受精 1 か月後）

以上の結果から、実験用魚類として重要なゼブラフィッシュにおいて、その始原生殖細胞のガラス化低温保存に最適な凍害防止溶液が開発されるとともに、新たに開発した凍害防止溶液を用いて低温保存した始原生殖細胞が機能的な配偶子へと発生・分化することを確認した。これにより、現在生体を継代飼育することで維持されている膨大な数のゼブラフィッシュの系統が、安価で安全に保存できるようになることが期待される。

本研究期間内には、始原生殖細胞と類似の方法で借腹生産に利用可能な精原細胞にも着目した。始原生殖細胞が初期胚にのみ少数存在するのに対し、精原細胞は成熟個体からも回収可能であり、その数は非常に多い。そこで、精原細胞を用いた遺伝資源の保存を目的とし、琵琶湖固有種であるホンモロコの精原細胞の低温保存についても検討した。その過程で、魚類精原細胞の培養に必須だと考えられるセルトリ細胞株の樹立にも成功した（図 6）。

図 6. 精巢由来細胞の初代培養 (a)、継代 7 (b)、継代 35 (c)、卵巣由来細胞の初代培養 (d)、継代 5 (e)、継代 20 (f)

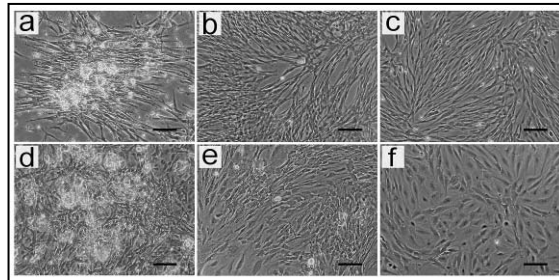


図 6. ホンモロコ雌雄生殖巣由来細胞株の樹立過程

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Higaki S, Koyama Y, Shirai E, Yokota T, Fujioka Y, Sakai N, Takada T, Establishment of testicular and ovarian cell lines from Honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*). Fish Physiology and Biochemistry, 査読有, vol. 39, 2012, 701-711. DOI: 10.1007/s10695-012-9733-y

〔学会発表〕（計 3 件）

① 発表者名: 檜垣彰吾・小山芳江・藤岡康広・池内俊貴・酒井則良・高田達之、発表標題: 琵琶湖固有種ホンモロコの細胞株樹立と環境バイオセンサーへの応用、発表学会名: 立命館大学琵琶湖Σ研究センター第 3 回シンポジウム、発表年月日: 2012 年 9 月 28 日、発表場所: 立命館大学びわこ・くさつキャンパスローム記念館（滋賀県）

② 発表者名: 島田愛美・檜垣彰吾・藤岡康弘・酒井則良・高田達之、発表標題: 琵琶湖固有種ホンモロコの雄性生殖細胞の培養と *in vitro* 精子形成、発表学会名: 立命館大学琵琶湖Σ研究センター第 3 回シンポジウム、発表年月日: 2012 年 9 月 28 日、発表場所: 立命館大学びわこ・くさつキャンパスローム記念館（滋賀県）

③ 発表者名: 島田愛美・檜垣彰吾・藤岡康弘・酒井則良・高田達之、発表標題: ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 雄性生殖細胞の培養と *in vitro* 精子形成、発表学会名: 第 105 回日本繁殖生物学会、発表年月日: 2012 年 9 月 8 日、発表場所: 筑波大学大学会館（茨城県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜垣 彰吾 (HIGAKI SHOGO)

立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・ポストドクトラルフェロー
研究者番号: 70595256